


1/1 FAMPAT - Patent Families - @QUESTEL-ORBIT

JP10033180 - RECOMBINED FRUCTOSYL AMINO ACID OXIDASE

| | |
|-------------|--|
| FAN | 20042782004052 |
| PN |  JP10033180 A 19980210 [JP10033180] |
| TI | RECOMBINED FRUCTOSYL AMINO ACID OXIDASE |
| PA | KYOTO DAIICHI KAGAKU KK |
| PA0 | (A) KDK CORP |
| IN | KATO NOBUO; SAKAI YASUYOSHI; TANI YOSHIKI; FUKUYA HIROSHI |
| AP | 1996JP-0194557 19960724 |
| PR | 1996JP-0194557 19960724 |
| IC | (Linked) C07H-021/00 C07H-021/04 C12N-001/19 C12N-009/06 C12N-015/09 C12P-021/02 C12Q-001/26 C12R-001:72 G01N-033/66 G01N-033/68 |
| ICAA | C07H-021/04 [2006-01 A - I R M EP]; C12N-001/19 [2006-01 A - I R M EP]; C12N-009/06 [2006-01 A - I R M EP]; C12N-015/09 [2006-01 A - I R M EP]; C12P-021/02 [2006-01 A - I R M EP]; C12Q-001/26 [2006-01 A - I R M EP]; G01N-033/66 [2006-01 A - I R M EP]; G01N-033/68 [2006-01 A - I R M EP] |
| ICCA | C07H-021/00 [2006 C - I R M EP]; C12N-001/19 [2006 C - I R M EP]; C12N-009/06 [2006 C - I R M EP]; C12N-015/09 [2006 C - I R M EP]; C12P-021/02 [2006 C - I R M EP]; C12Q-001/26 [2006 C - I R M EP]; G01N-033/66 [2006 C - I R M EP]; G01N-033/68 [2006 C - I R M EP] |
| FI | G01N33/66; G01N33/68; C12N15/00 ZNAA; C12N9/06 B; C12N9/06; C12Q1/26; C12P21/02 C; C12N1/19; C12R1:72; C07H21/04 B |
| FTM | 2G045 AA13; 2G045 AA16; 2G045 AA28; 2G045 BB20; 2G045 CB01; 2G045 CB21; 2G045 DA17; 2G045 DA20; 2G045 DA30; 2G045 DA44; 2G045 DB00; 2G045 FB04; 2G045 GC30; 4B024 AA01; 4B024 AA05; 4B024 AA11; 4B024 BA08; 4B024 CA12; 4B024 DA12; 4B024 EA04; 4B050 CC03; 4B050 DD03; 4B050 LL01; 4B050 LL02; 4B050 LL03; 4B063 QA01; 4B063 QA18; 4B063 QQ79; 4B063 QR03; 4B063 QR23; 4B063 QS38; 4B063 QX01; 4B064 AG01; 4B064 CA05; 4B064 CA06; 4B064 CA19; 4B064 CC03; 4B064 CC24; 4B064 CD02; 4B064 CD06; 4B064 CD21; 4B064 DA07; 4B064 DA10; 4B064 DA13; 4B065 AA60.Y; 4B065 AA72.X; 4B065 BB02; 4B065 BB06; 4B065 BB29; 4B065 CA28; 4B065 CA41; 4B065 CA44; 4B065 CA46; 4C057 BB02; 4C057 BB05; 4C057 DD01; 4C057 MM04; 4C057 MM09 |
| CT | (JP10033180) [19] Citation as reason for refusal of an application JP (A) 1998033177 [JP10033177] |
| AB | (JP10033180) PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject recombined fructosyl amino acid oxidase necessary for the quantitative analyses of amadori compounds useful for diagnosing the syndromes of diabetes, maintaining the qualities of foods, etc., by transforming a eukaryocyte with an expression vector containing a DNA coding the subject enzyme originated from an Aspergillus fungus and subsequently culturing the transformed eukaryocyte. SOLUTION: This recombined fructosyl amino acid oxidase is obtained by inserting a gene coding the fructosyl amino acid oxidase, preferably a gene coding the subject enzyme produced from Aspergillus terreus GP1: FERM P-15664), into a proper expression vector, transforming a eukaryocyte with the obtained functional expression vector (e.g. plasmid pNFL 8), and subsequently culturing the obtained transformant. Methanol yeast is preferable as the eukaryocyte. COPYRIGHT: (C)1998,JPO |
| UP | 2000-08 |

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-33180

(43)公開日 平成10年(1998) 2月10日

| (51)Int.Cl. ⁹ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|-------|---------|---------------|---------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | 9282-4B | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| C 0 7 H 21/04 | | | C 0 7 H 21/04 | B |
| C 1 2 N 1/19 | | | C 1 2 N 1/19 | |
| 9/06 | | | 9/06 | B |
| C 1 2 P 21/02 | | | C 1 2 P 21/02 | C |

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-194557

(22)出願日 平成 8 年(1996) 7 月24日

(71)出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72)発明者 加藤 暢夫

京都府亀岡市西つづじヶ丘美山台2丁目3
番18号

(72)発明者 阪井 康能

滋賀県大津市本宮2丁目40-8

(72)発明者 谷 ▲吉▼樹

京都府京都市北区上賀茂菟蓐園町56, 60番
合地-1

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

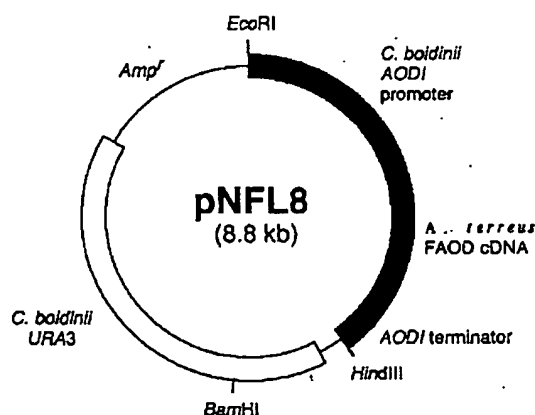
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 組換えフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ

(57)【要約】

【課題】 DNA組換え技術によるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造。

【解決手段】 異種遺伝子を導入された真核細胞により生産されたことを特徴とするフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 アスペルギルス属 (*Aspergillus*) の菌に由来するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする異種遺伝子を導入された真核細胞により生産されたことを特徴とするフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項2】 アスペルギルス属の菌がアスペルギルス・テレウス GP1 (*Aspergillus terreus* GP1; FERM-15664) である請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項3】 異種遺伝子が、mRNAから逆転写酵素により合成されたDNA又はその断片である請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項4】 異種遺伝子が、mRNAからRT-PCRにより合成されたDNA又はその断片である請求項1記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをコードする遺伝子含有し、真核細胞内で機能的な発現ベクター。

【請求項6】 プラスミドpNFL8である請求項5記載の発現ベクター。

【請求項7】 請求項5又は6に記載の発現ベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項8】 酵母である請求項7記載の形質転換体。

【請求項9】 メタノール酵母である請求項8記載の形質転換体。

【請求項10】 請求項8又は9に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とするフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法。

【請求項11】 培地が、メタノール0.1～5.0%、及び0.1～5.0%のNH₄Cl及び/又は0.1～5.0%の酵母エキスを含有するものである請求項10記載の方法。

【請求項12】 アマドリ化合物を含有する試料と、請求項7～9のいずれかに記載の宿主細胞の培養物又はその処理物を接触させ、酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法。

【請求項13】 試料が生体成分であり、アマドリ化合物の分析が、該生体成分中の糖化タンパクの量及び/又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量によりなされることを特徴とする請求項12記載の分析法。

【請求項14】 請求項7～9のいずれかに記載の宿主細胞の培養物またはその処理物を含有するアマドリ化合物の分析のための試薬又はキット。

【請求項15】 生体成分中の糖化タンパクの量及び/又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量のために用いられることを特徴とする請求項14記載の試薬又はキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

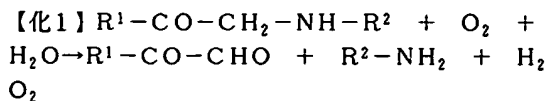
【発明の属する技術分野】本発明は、DNA組換え技術によるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、FAOD-Lと称する）の真核細胞による製造に関し、より詳しくは、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 由来のFAOD-Lをコードする遺伝子含有し、真核細胞内で機能的な発現ベクター、該発現ベクターにより形質転換された真核細胞、得られた形質転換体を培養することによる組換えFAOD-Lの製造、そのようにして得られる組換えFAOD-L、該組換えFAOD-Lを用いるアマドリ化合物の分析法及び該分析法に有用な試薬に関する。

【0002】

【従来技術】アマドリ化合物は、タンパク質、ペプチド及びアミノ酸のようなアミノ基を有する物質と、アルドースのような還元性の糖が共存する場合、アミノ基とアルデヒド基が非酵素的かつ非可逆的に結合し、アマドリ転移することにより生成される物質であり、醤油等の食品、及び血液等の体液に含有されている。その生成速度は、反応性物質の濃度、接触時間、温度などの関数であることから、生成量を測定することにより、それら反応性物質を含有する物質に関する様々な情報を得ることができる。例えば、生体内では、グルコースとアミノ酸が結合したアマドリ化合物であるフルクトシルアミン誘導体が生成しており、血液中のヘモグロビンが糖化されたフルクトシルアミン誘導体はグリコヘモグロビン、アルブミンが糖化された誘導体はグリコアルブミン、血液中のタンパクが糖化された誘導体はフルクトサミンと呼ばれる。これらの血中濃度は、過去の一定期間の平均血糖値を反映しており、その測定値は、糖尿病の症状の重要な指標となり得るために、測定手段の確立は臨床上、極めて有用である。また、食品中のアマドリ化合物を定量することにより、その食品の製造後の保存状況や期間を知ることができ、品質管理に役立つと考えられる。このように、アマドリ化合物の定量分析は医学及び食品を含む広範な分野で有用である。

【0003】従来、アマドリ化合物を含有する試料に酸化還元酵素を作用させ、酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することにより、定量する分析法が提案されている（例えば、特公平5-33997号公報、特開昭61-268178号公報、特開平2-195900号公報、特開平3-155780号公報）。さらに、糖尿病の診断のための糖化タンパクの定量法も開示されている（特開平2-195899号公報、特開平2-195900号公報）。

【0004】アマドリ化合物の酸化還元酵素による分解反応は下記的一般式で表すことができる。



(式中、R¹はアルドース残基、R²はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す)

本出願人は、上記の目的に適う酵素として、フサリウム属 (*Fusarium*) 由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAOD-L及びFAOD-S) を精製し、その有用性を明らかにした (特開平8-154672、特開平7-289253)。また、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) が、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (FAOD-L) を生産することも明らかにした。

【0005】

【発明が解決すべき課題】しかしながら、微生物を培養し、培地から該酵素を抽出して製造する方法は、多くの労力と時間を必要とし、非効率的である。また、精製法で得られる酵素には、フサリウム属又はアスペルギルス属の菌株固有のタンパク質等の不純物が付随する確立が高く、そのような不純物には、FAOD-L活性に悪影響を及ぼす物質が混在する可能性があり、測定の信頼性が十分に確保できない恐れがあった。従って、フサリウム属またはアスペルギルス属の菌に由来する不純物を伴わないFAOD-Lを効率よく製造する方法の開発が求められていた。そのためには、フサリウム属又はアスペルギルス属由来のFAOD-LをコードするDNAをクローニングし、該DNAを含有する適当な発現ベクターを構築し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換体を適当な培地で培養することにより、解決することができる。しかしながら、フサリウム属またはアスペルギルス属由来のFAOD-LをコードするDNAがクローニングされた例はなく、まず、そのようなDNAのクローニングが必要であった。

【0006】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、アスペルギルス・テレース GP1 (*Aspergillus terreus* GP1:FERM-15664) が産生するFAOD-LをコードするDNAをクローニングし、該DNAを含有する発現ベクターを構築し、該発現ベクターで大腸菌を形質転換し、得られた大腸菌形質転換体 (*E. coli* SOLR/pFAL2及び*E. coli* JM109/pFAL2) を培養することにより、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有する組換えFAOD-Lを製造した。

【0007】しかしながら、本来、真核生物であるアスペルギルス・テレース GP1 (*Aspergillus terreus* GP1:FERM-15664) が生産していたFAOD-Lを原核生物に生産させると、インクルージョンボディ (封入体) を形成し、効率的な酵素の生産を確保できない恐れがある。このような現象は当業者に公知であり、多くの文献に記載されている (例、ラボマニユアル遺伝子工学増補版、丸善株式会社、187頁参照)。従って、FAOD-Lをコードする遺伝子 (又はDNA) を含有し、真核細胞を形質転換することが可能な発現ベクターを構築し、該発現ベクターで真核細胞を形質

転換し、得られた形質転換体を培養して酵素を生産させる方法の開発が必要であった。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、FAOD-Lをコードする遺伝子 (又はDNA) を適当な発現ベクターに挿入し、得られたベクターを用いて真核細胞を形質転換し、FAOD-Lを生産させることに成功した。すなわち、本発明はアスペルギルス属 (*Aspergillus*) の菌に由来するFAOD-Lをコードする異種遺伝子を導入された真核細胞により生産されたことを特徴とするFAOD-Lを提供するものである。異種遺伝子としては、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) の菌に由来するFAOD-Lをコードする遺伝子であることが好ましく、アスペルギルス・テレースGP1 (*Aspergillus terreus* GP1:FERM-15664) 由来のFAOD-Lをコードする遺伝子がより好ましい。本発明のFAOD-Lは、例えば、後述する実施例に記載のごとく原核性宿主を形質転換して得られる形質転換体 (例、*E. coli* SOLR/pFAL2又は*E. coli* JM109/pFAL2) から得られるFAOD-LをコードするDNA断片を真核細胞に発現させることによって得ることができる。

【0009】さらに、本発明は、上記のFAOD-Lをコードする異種遺伝子を含有し、真核細胞内で機能的な発現ベクターを提供するものである。該遺伝子は、好ましくはアスペルギルス属 (*Aspergillus*) の菌、より好ましくはアスペルギルス・テレース GP1 (*Aspergillus terreus* GP1:FERM-15664) 由来のFAOD-Lをコードする遺伝子である。そのような発現ベクターには、実施例に記載の原核性形質転換体である*E. coli* SOLR/pFAL2又は*E. coli* JM109/pFAL2から得られるFAOD-LをコードするDNA断片を含有させてもよい。最も好ましい発現ベクターはプラスミドpNFL8である。本明細書中、発現ベクターが真核細胞内で「機能的」であるとは、該ベクターを真核細胞に導入したとき、得られた形質転換体が適当な培地で増殖し、該ベクターに含有されている異種のFAOD-Lを生産しうることを意味する。「異種遺伝子」とは、FAOD-Lを生産する真核細胞固有の遺伝子以外の外来性遺伝子であることを意味する。なお、本明細書中、「遺伝子」及び「DNA」なる語句は、起源に関係なく、目的のFAOD-L活性を有するペプチドをコードすることを条件として、相互変換可能に用いられる。

【0010】本発明はまた、上記発現ベクターで真核細胞を形質転換して得られる形質転換体を提供するものである。真核細胞は、好ましくは酵母、より好ましくはメタノール酵母である (メチロトロフ酵母またはメタノール資化性酵母)。さらに、本発明は、これらの形質転換

体を培地に培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とするフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法を提供するものである。また、本発明は、アマドリ化合物を含有する試料と、これら形質転換体の培養物又はその処理物を接触させ、酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法を提供するものである。本発明の分析法は、アマドリ化合物を含有する試料の全てに適用可能であるが、生体成分であることが好ましい。また、その場合、該生体成分中の糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量により行うことが好ましい。本発明はまた、上記の形質転換体の培養物又はその処理物を含有するアマドリ化合物の分析のための試薬又はキットを提供するものである。該試薬及びキットは、好ましくは生体成分中の糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量のために用いられるものである。

【0011】本発明のFAOD-Lは、以下の特性：

(1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化して、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素活性を有し；

(2) SDS-PAGEにより測定したとき、分子量約48,000ダルトンの同一サブユニット2個より成り；

(3) そのN末端に配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を、また、中間に配列番号3で示されるアミノ酸配列を有し；かつ

(4) アスペルギルス属 (*Aspergillus*) の菌由来の他のタンパク質を実質上含有しない；を有するペプチド又はその酵素活性を有するフラグメントである。本発明のFAOD-L又はそのフラグメントは、配列番号1記載のアミノ酸配列又はその部分配列を含有することが好ましい。また、本発明の発現ベクターは、1つの実施態様として、配列番号1記載の塩基配列又はその部分配列を含有する。

【0012】本明細書中、培養物の「処理物」とは培養物から得られる物質であって、上記式(I)で示される反応を触媒する酵素活性を高め、及び／又は酵素活性の利用をより容易にするために、当該技術分野で通常の方法により処理された物質を指す。FAOD-L活性が形質転換体細胞内に止まっている場合、処理物の例として以下のものを挙げることができる。

(1) 生の細胞：ろ過又は遠心等の通常の方法で培養物から分離された細胞。

(2) 乾燥細胞：(1)の生細胞を凍結乾燥又は真空乾燥したもの。

(3) 細胞抽出物：(1)又は(2)の細胞を通常の方法（例えば有機溶媒中での自己溶菌、アルミナや海砂と混合しての摩砕、又は超音波処理）して得られる。

(4) 酵素溶液：細胞抽出物を常法通り精製するか部分精製することにより得られる。

(5) 精製酵素：(4)に記載の酵素溶液をさらに精製し、不純物を含まないもの。

(6) 酵素活性を有するフラグメント；精製酵素等を適当な方法で断片化処理することにより得られるペプチドフラグメント。

(7) 固定化細胞又は酵素：細胞又は酵素を通常の方法で固定化（例えばポリアクリルアミド、ガラスビーズ、イオン交換樹脂等に固定化）したもの。培地に分泌される場合は、培養物そのもの及びそれから精製される酵素（溶液、凍結乾燥品、断片化したフラグメント等）及び固定化酵素が培養物又は処理物の例として挙げられる。本発明の目的には、酵素活性を有するフラグメントも有用であり、そのような「酵素活性を有するフラグメント」は、(6)に記載のごとく、FAOD-L活性を有し、本発明の目的に有用なペプチドフラグメントを指す。それは、例えば、上記(5)の精製酵素を、適当な方法で断片化処理することにより得ることができ、培養物の処理物の1つである。なお、本明細書で、単にFAOD-Lというときにも、上記の培養物の処理物の1つを表す場合がある。

【0013】

【発明の実施の形態】FAOD-Lの真核細胞での生産のための発現ベクターの構築、形質転換及び形質転換体の培養は、当該技術分野で既知の方法に従って行うことができる。本発明のFAOD-Lの生産に適した真核細胞としては、酵母、特に *Saccharomyces* 属に属する株（例えば、*S. cerevisiae*）や *Candida* 属に属する株（例えば、*C. boidinii*）、動物細胞又は培養植物細胞、例えば、マウスL929細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などが例示される。通常、発現には菌体内発現と分泌発現の2種類があるが、各々について適当な発現系が存在する。例えば、酵母形質転換体に、発現産物を細胞外に分泌させる必要があれば、FAOD-LをコードするDNAのN末端に宿主酵母由来の分泌蛋白質のシグナル配列の遺伝子を連結させて、発現産物をペリプラスムに分泌させるよう、発現系を構築する。

【0014】真核性宿主に使用するのに適した発現ベクターは既知であり、それらから任意に選択することができるが、酵母でのFAOD-Lの発現のための発現ベクターとしては、GALプロモーターやAODプロモーター等のプロモーターを含有するものが好ましい。又、哺乳動物細胞でのFAOD-L発現のための発現ベクターとしては、SV40プロモーター等のプロモーターを有するものが挙げられる。また、発現効率を高めるために、当該技術分野で既知の多コピー型プラスミドを用いて、多コピー型発現ベクターを構築することもできる。FAOD-L発現ベクターの構築は、適当な方法で得ら

れるFAOD-Lをコードする遺伝子又はDNA、例えばmRNAの逆転写によって得られるcDNA、既にクローン化されたDNA、あるいは合成DNA等を、適当な発現ベクターに挿入することにより行うことができ、そのような方法は当該技術分野で既知である。

【0015】以下に、酵母での発現に適した発現ベクターの構築方法を示すが、これは1例にすぎず、本発明は以下の発現ベクターに限定されるものではない。酵母でのFAOD-L遺伝子の発現のために、*C. boidinii*の染色体挿入型発現ベクターであるプラスミドpNOTel（特開平5-344895）を用い、FAOD-L発現ベクターを構築する。このプラスミドpNOTelは、AODプロモーターとURA3遺伝子を含んでおり、該プラスミドで形質転換された形質転換体を、Ura要求を指標として選抜する手段を与えることができる。まず、クローン化FAOD-L cDNAを含む大腸菌発現ベクターpFAL2を、実施例の記載に従って得られる*E. coli* SOLR/pFAL2又は*E. coli* JM109/pFAL2から得、これを鋳型としてFAOD-LのN末端とC末端に相当する2種のプライマー（配列番号4及び5）を用いてPCRを行い、約1.3 kbのFAOD-L cDNA断片を得、精製した。他方、プラスミドpNOTelを制限酵素NotIにより消化した後、ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸化処理し、上記のFAOD-L cDNA断片と共にDNA Blunting Kit（宝酒造株式会社）を用いて平滑化した。これらをDNA ligation Kit（宝酒造株式会社）を用いて連結し、プラスミドpNFLを得た。これを大腸菌にHanahan法（Hanahan, D, Techniques for Transformation of *E. coli*. In: DNA Cloning, vol I, Glover, D. M. (ed), pp109-136, IRL Press, 1985）で形質転換し、得られた形質転換体から任意に84株を選択してプラスミドを調製した。プラスミドを制限酵素HindIIIで処理して挿入片の方向性を確認し、FAOD-L cDNA断片がAODプロモーターの下流に挿入されているプラスミドpNFL8を得た。該プラスミドpNFL8の制限地図は図5に示されている。

【0016】上記のプラスミドpNFL8を用い、Ura要求性の*C. boidinii* TK62株を形質転換し、形質転換体をUraを含まないYNB培地で培養した。URA⁺型形質転換体から任意に14株を選び、これらの株をメタノール含有基本培地で培養すると、その11株が後述の表1に示すように、FAOD-Lを生産した。形質転換体のサザン解析の結果、大多数の形質転換体がシングルコピーを有していることがわかった。

【0017】発現ベクターによる宿主細胞の形質転換は既知であり、Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載の方法で行うことができる。真核性宿主の場合は、コンピテントセル作製法、エレクトロポレーション法、リチ

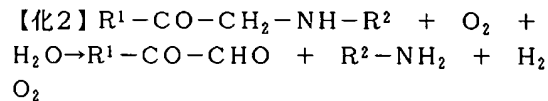
ウム改変法、哺乳動物細胞の場合はトランスフェクション法、エレクトロポレーション法により行うことができる。形質転換体の培養に用いる培地は、炭素源（例えばグルコース、メタノール、ガラクトース、フルクトース等）及び無機または有機窒素源（例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸ナトリウム、ペプトン、カザミノ酸等）を含有してよい。所望により、培地に他の栄養源（例えば無機塩類（塩化ナトリウム、塩化カリウム）、ビタミン類（例えばビタミンB₁）、抗生物質（例えばアンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン等））を加えてもよい。哺乳動物細胞の培養には、イーグル培地が適当である。本発明のFAOD-Lの製造に適した培地は、0.1～5.0%、好ましくは0.5～2.0%のNH₄Cl及び/又は0.1～5.0%、好ましくは1%の酵母エキスを含有する、メタノール0.1～5.0%、好ましくは1.5%を含有する基本培地である。例えば、後述の表2及び3には、宿主細胞がメタノール酵母である場合の培地条件の比較が示されている。表から、1.5%メタノール含有基本培地でも十分にFAOD-Lが生産されるが、窒素源としてNH₄Clを含有することが好ましく、酵母エキスの濃度が約1%であることが好ましいことが分る。

【0018】形質転換体の培養は、通常、pH5.0～8.0、好ましくはpH5.5～6.0、25～40℃（好ましくは28℃）で16～96時間行えばよい。生産されたFAOD-Lが培養溶液、培養上清（上澄み）中に存在しているときは、培養物を濾過又は遠心分離する。培養上清から、FAOD-Lを天然又は合成のタンパク質の精製、単離に一般的に用いられる常法（例えば透析、ゲル濾過、抗FAOD-Lモノクローナル抗体を用いたアフィニティカラムクロマトグラフィー、適当な吸着剤を用いたカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等）によって精製できる。生産されたFAOD-Lが培養形質転換体のペリプラズム及び細胞質中に存在するときは、濾過や遠心分離によって細胞を集め、それらの細胞壁及び/又は細胞膜を、たとえば超音波及び/又はリゾチーム処理によって、破壊して、デブリス（細胞破砕物）を得る。デブリスを適当な水溶液（例えばトリス-塩酸緩衝液）に溶解させる。この溶液から、常法によって、FAOD-Lを精製することができる。

【0019】形質転換体中で生産されたFAOD-Lを再生（リフォールディング）する必要があるときは、これを常法によって行なうことができる。本発明方法で得られる形質転換体を適当な培地で培養して得られる培養物はFAOD-L活性を示すが、このものを上記のごとく当業者既知の通常の方法でさらに処理して酵素溶液等の処理物を調製することができる。また、所望により精製してもよい。例えば、培養物を遠心してFAOD-L生産形質転換体を収穫し、りん酸緩衝液に懸濁し、音

波処理等によって細胞を破壊する。次いで、上清を遠心分離することにより、酵素標品を得る。さらに、上清を透析し、クロマトグラフィー等でさらに精製すれば精製酵素が得られる。次いで、制限酵素処理やエキソヌクレアーゼ処理等により、酵素活性を有するフラグメントを得ることができる。

【0020】上記の培養物、その処理物（精製酵素標品及び酵素活性を有するフラグメントを含む）は、FAOD-L酵素活性を有し、アマドリ化合物の定量分析に適しており、例えば、糖尿病の診断に有用である。既述のごとく、本発明の形質転換体を培養して得られる培養物及びその処理物は以下の反応式：



（式中、 R^1 はアルドース残基、 R^2 はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す）で示されるアマドリ化合物の酸化還元反応を触媒する。上記式において、 R^1 が $-\text{OH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、又は $-\text{[CH(OH)]}_n-\text{CH}_2\text{OH}$ （式中、 n は0-6の整数）であり、 R^2 が $-\text{CHR}^3-\text{[CONHR}^3\text{]}_m\text{COOH}$ （式中、 R^3 は α -アミノ酸側鎖残基、 m は1-480の整数を表す）で示されるアマドリ化合物が基質として好ましい。中でも、 R^3 がリジン、ホリリジン、バリン、アスパラギンなどから選択されるアミノ酸の側鎖残基であり、また n が5-6、 m が5以下である化合物が好ましい。

【0021】本発明の分析法を行うには、アマドリ化合物を含有すると考えられる試料と本発明のFAOD-Lを発現する形質転換体の培養物又はその処理物を、水又は緩衝液中で接触させ、酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することにより、試料中のアマドリ化合物を分析する。本発明の分析法は、生体成分中の、糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量に基づいて行われる。例えばアマドリ化合物を含有する緩衝液中の試料に、培養物又はその処理物の水又は緩衝液中懸濁液（溶液）を加える。pH、温度及び反応時間等の反応条件は特に限定されるものでなく、同様の酵素反応に通常用いられる条件から適宜選択するとよい。しかしながら、約pH4.0-12.0、好ましくはpH7.0-9.0であり、より好ましくはpH約8.0、温度25-50℃、好ましくは25-40℃、より好ましくは35℃で反応させる。

【0022】本発明方法に用いる被検液としては、アマドリ化合物を含有する任意の試料溶液を用いることができ、例えば、血液（全血、血漿又は血清）、尿等の生体由来の試料の外、醤油等の食品が挙げられる。緩衝液としてはトリス-塩酸緩衝液等を用いる。FAOD-L、FAOD-Lを発現する形質転換体の培養物又はその処理物の使用量は、終点分析法においては通常、0.1単位/ml以上、好ましくは1-100単位/mlである。本

発明の分析法では、下記のいずれかのアマドリ化合物の定量法を用いる。

（1）過酸化水素発生量に基づく方法

当該技術分野で既知の過酸化水素の定量法、例えば、発色法、過酸化水素電極を用いる方法等で測定し、過酸化水素及びアマドリ化合物の量に関して作成した標準曲線と比較することにより、試料中のアマドリ化合物を定量する。具体的には、後述の力価の測定法に準じる。ただし、FAOD-L量は1ユニット/mlとし適当に希釈した試料を添加し、生成する過酸化水素量を測定する。過酸化水素発色系としては、4-アミノアンチピリン/フェノール系のかわりに4-アミノアンチピリン/N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、4-アミノアンチピリン/N,N-ジメチルアニリン、4-アミノアンチピリン/N,N-ジエチルアニリン、MBTH/N,N-ジメチルアニリン、4-アミノアンチピリン/2,4-ジクロロフェノール等の組み合わせが可能である。

【0023】（2）酸素の消費量に基づく方法

反応開始時の酸素量から反応終了時の酸素量を差し引いた値（酸素消費量）を測定し、酸素消費量とアマドリ化合物の量に関して作成した標準曲線と比較することにより、試料中のアマドリ化合物を定量する。具体的には、後述の力価の測定法に準じて行う。但し用いるFAOD-L量は1ユニット/mlとし、適当に希釈した試料を添加し吸収される酸素量を求める。

【0024】本発明方法は試料溶液をそのまま用いて行うこともできるが、対象によっては、あらかじめ糖が結合したリジン残基を遊離させてから行うことが好ましい。そのような目的には、タンパク質分解酵素を用いる場合（酵素法）と、塩酸等の化学物質を用いる場合（化学法）があるが、前者が好ましい。本発明方法に用いることができるタンパク質分解酵素は、当業者に既知であり、トリプシン、カルボキシペプチダーゼB、パパイ、アミノペプチダーゼ、キモトリプシン、サーモリシン、ズブシリシン、プロティナーゼK、プロナーゼ等を挙げることができる。酵素処理の方法も既知であり、例えばプロテアーゼ処理は、下記実施例に記載の方法で行うことができる。

【0025】上記のごとく、本発明のFAOD-Lを発現する形質転換体の培養物又はその処理物は、糖化タンパクに含まれるフルクトシルリジンに高い基質特異性を有するものであることから、血液試料中の糖化タンパクを測定することを含む、糖尿病の診断などに有用である。また、フルクトシルバリンにも特異性を有することから、糖化ヘモグロビンの測定にも有用である。なお、検体として血液試料（全血、血漿又は血清）を用いる場合、採血した試料をそのまま、あるいは透析等の処理をした後用いる。さらに、本発明方法に用いるFAOD-Lを発現する形質転換体の培養物又はその処理物、ある

いはパーオキシダーゼ等の酵素は、溶液状態で用いてもよいが、適当な固体支持体に固定化してもよい。例えば、ビーズに固定化した酵素をカラムに充填し、自動化装置に組み込むことにより、臨床検査など、多数の検体の日常的な分析を効率的に行うことができる。しかも、固定化酵素は再使用が可能であることから、経済効率の点でも好ましい。さらには、酵素と発色色素とを適宜組み合わせ、臨床分析のみならず、食品分析にも有用なアマドリ化合物の分析のためのキットを得ることができる。

【0026】酵素の固定化は当該技術分野で既知の方法により行うことができる。例えば、担体結合法、架橋化法、包括法、複合法等によって行う。担体としては、高分子ゲル、マイクロカプセル、アガロース、アルギン酸、カラギーナンなどがある。結合は共有結合、イオン結合、物理吸着法、生化学的親和力を利用し、当業者既知の方法で行う。固定化酵素を用いる場合、分析はカラム又はバッチ方式のいずれでもよい。上記のごとく、固定化酵素は、血液試料中の糖化タンパクの日常的な分析（臨床検査）に特に有用である。臨床検査が糖尿病診断を目的とする場合、診断の基準としては、結果を糖化タンパク濃度として表すか、試料中の全タンパク濃度に対する糖化タンパク質の濃度の比率で表される。全タンパク濃度は、通常の方法（280nmの吸光度、Lowry法あるいは、アルブミンの自然蛍光など）で測定することができる。

【0027】本発明のアマドリ化合物の定量のための試薬は、本発明のFAOD-Lを発現する形質転換体の培養物又はその処理物、及び好ましくはpH7.0～9.0、より好ましくはpH8.0の緩衝液からなる。該培養物又はその処理物が固定化されている場合、固体支持体は高分子ゲルなどから選択され、好ましくはアルギン酸である。試薬中の培養物又はその処理物の量は、終点分析を行う場合、試料あたり、通常1～100単位/ml、バッファーはトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）が好ましい。過酸化水素の生成量に基づいてアマドリ化合物を定量する場合、発色系としては、上記の各種の組み合わせを利用することが可能である。本発明のアマドリ化合物の分析試薬と、適当な発色剤ならびに比較のための色基準あるいは標準物質を組み合わせることもできる。そのようなキットは、予備的な診断、検査に有用であると考えられる。

【0028】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を詳しく説明するが、これらは本発明を制限するものではない。以下の実施例において用いたプラスミド類、様々な制限酵素等の酵素類は、市販品から入手し、供給者の指示に従って使用するが、文献記載の方法で製造することができる。また、プラスミドの構築、宿主の形質転換、形質転換体の培養及び培養物からの酵素の回収は、当業者既知の方

法、あるいは文献記載の方法に準じて行なった。また、酵素活性は以下の力価の測定法に従って測定した。

力価測定法

（1）生成する過酸化水素を比色法により測定する方法。

A.速度法

100mM FZL溶液はあらかじめ得られたFZLを蒸留水で溶解することによって調製した。45mM 4-アミノアンチピリン、60ユニット/mlパーオキシダーゼ溶液、及び60mM フェノール溶液それぞれ100μlと、0.1M トリス-塩酸緩衝液（pH8.0）1ml、及び酵素溶液50μlを混合し、全量を蒸留水で3.0mlとする。30℃で平衡化した後、100mM FZL溶液50μlを添加し、505nmにおける吸光度を経時的に測定した。生成するキノン色素の分子吸光係数（ $5.16 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ）から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位とする。

【0029】B.終末法

上記A法と同様に処理し、基質添加後、20分間30℃でインキュベートした後の505nmにおける吸光度を測定し、別にあらかじめ標準過酸化水素溶液を用いて作成した検量線から生成した過酸化水素量を算出することにより、酵素活性を測定する。

（2）酵素反応による酸素吸収を測定する方法

0.1M トリス-塩酸緩衝液1mlと酵素溶液50μlを混合し、蒸留水で全量を3.0mlとし、ラング ブラザー社の酸素電極のセルに入れる。30℃で攪拌し、溶存酸素と温度を平衡化した後、50mM FZL 100μlを添加し、酸素吸収を記録計で連続的に計測し、初速度を得る。標準曲線から1分間に吸収された酸素量を求め、これを酵素単位とする。

【0030】実施例1 FAOD-LをコードするDNAのクローニング

1. アスペルギルス・テレウスGP1 (*Aspergillus terreus* GP1; FERMP-15664) のFAOD-Lの部分アミノ酸配列の決定

1) *A. terreus* GP1の培養及びFAOD-Lの精製
Aspergillus terreus GP1 (P-15664) をFZL 0.5%、グルコース 1.0%、リン酸二カリウム 0.1%、リン酸一ナトリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.05%、塩化カルシウム 0.01%、イーストエキス 0.2%を含有した培地（pH6.0）10Lに植菌し、ジャーファーマンターを用いて通気量2L/分、攪拌速度400rpmの条件で28℃、24時間攪拌培養した。培養物は濾過して集めた。菌糸体259g（湿重量）を、2mMのDTTを含む、0.1Mトリス-塩酸緩衝液（pH8.5）800mlに懸濁し、ダイノ・ミルにより菌糸体を破碎した。破碎液を9,500rpmで20分間遠心分離し、得られた液を粗酵素液とし、以下

の方法で精製した。

【0031】粗酵素液に40%飽和になるように硫酸アンモニウム（以下、硫酸と略す）を加え、攪拌し、12,000rpmで10分間遠心分離した。得られた上清に75%飽和になるように硫酸を加え、攪拌し、12,000rpmで10分間遠心分離した。沈殿を2mMのDTTを含有する50mM トリスー塩酸緩衝液（pH8.5）（以下、緩衝液Aと略す）に溶解した。その溶液に硫酸40%を含む緩衝液Aを等量加え、次いで、約200mlのブチル-Toyo Pearl（butyl-TOYOPEARL）樹脂を加え、穏やかに攪拌した。同緩衝液で洗浄後、緩衝液Aを用い、バッチ法で溶出した。溶出液を硫酸濃縮し、25%飽和硫酸を含む緩衝液Aで平衡化したフェニル-Toyo Pearl（phenyl-TOYOPEARL）カラムに吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫酸濃度25-0%飽和の直線勾配で溶出した。活性画分を集め、硫酸濃縮後、40%飽和硫酸を緩衝液Aで平衡化したブチル-Toyo Pearlカラムに吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫酸濃度40-0%飽和の直線濃度勾配にて溶出した。活性画分を統合し、緩衝液Aで平衡化したDEAE-Toyo Pearlカラムに供した。活性画分は同緩衝液による洗浄画分に認められたので、これを集め、硫酸濃縮した。続いて得られた酵素溶液を0.1M NaCl、2mM DTTを含む0.1Mトリスー塩酸緩衝液（pH8.5）にて平衡化したセファクリルS-300カラムによりゲル濾過を行い、70~100ユニットの精製酵素を得た。

【0032】得られた精製酵素標品をSDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動）において、標準タンパクとしてホスホリラーゼB、牛血清アルブミン、オボアルブミン、カルボニックアンヒドラーゼ、大豆トリプシンインヒビターを用い、デービスの方法に従って分子量を測定した。即ち、10%ゲルを用いて、40mAで3時間泳動し、クーマシーブリリアントブルーG-250でタンパク染色を行った。分子量既知の数種のタンパクについて同様に泳動し、検量線から分子量を求めた結果、サブユニットの分子量は約48,000ダルトンであることが示された（図6）。また、スーパーデックス200pgによるゲルろ過による分子量測定では、図7の検量線図から明らかのように、約94,000ダルトンであった。

【0033】2）部分アミノ酸配列の決定
上記の方法で精製した酵素標品をV8プロテアーゼ（シグマ社製）により断片化し、クリーブランド法 [D.W. Cleaveland, S.G. Fisher, M.W. Kirschner and U.K. Laemmli, *J. Biol. Chem.*, 252, 1102 (1977)] によりさらに断片化した。次いで、PVDF（ポリビニリデン フル

オリド、ミリボア社製、商品名、イモビロン-PSQ）膜にトランスファー（14Vで一晩（12時間））し、プロテインシーケンサー476A（アプライドバイオシステムズ社）を用い、エドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した。その結果、N-末端及び内部ペプチドの2断片からそれぞれ、配列番号2及び3に示す17及び16残基のアミノ酸配列が決定された。

【0034】2. RT-PCRによる部分cDNA断片の増幅

1）オリゴヌクレオチドプライマーの調製

上記1. 2）で得たアミノ酸配列から推定される塩基配列を基に、PCR（ポリメラーゼチェーン反応）に用いるためのプライマーを、図1に示すように設計した。このプライマーの設計に際して、アスペルギルス属のコードン使用率を考慮に入れ、またサブクローニングを容易にするために、プライマーの端にBamHI認識配列を付加した。これらプライマー1及び2の塩基配列をそれぞれ、配列番号4及び5に示す。なお、プライマー2は、プライマー1が付着するDNAに相補なDNAに付着するよう、図1に記載の配列に基づき、そのC末端側から合成されている。

【0035】2）total RNAの調製

上記1. 1）の方法で培養した *A. terreus* GP1株の菌糸体1gからグアニジン/フェノール/クロロホルム法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-PhOH-chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162, 156-159) に従って、total RNA 5mgを得た。

【0036】3）RT-PCR

上記1. 2）で設計したプライマーと、2. 2）で調製したtotal RNAを用い、以下の手順で逆転写ポリメラーゼチェーン反応（RT-PCR）を行った。

a) total RNA (5 µg/µl) 2 µlに滅菌水36 µlを加え、65℃、5分加温した後、氷上で急冷する。

b) a) の溶液に以下の溶液を加える。

| | |
|----------------------------|-------|
| 5×buffer | 20 µl |
| dNTPmix (各20 mM) | 5 µl |
| RNase inhibitor (115 U/ml) | 2 µl |
| Oligo dt (0.42 µg/µl) | 24 µl |
| RTase (MLV) (200 U/µl) | 1 µl |
| DTT (0.1 M) | 10 µl |

c) a) + b) の溶液を25℃、10分放置した後、42℃で一晩反応させる。そして、95℃で5分加熱した後、氷上で急冷するとcDNAが得られる。

d) c) で合成したcDNA 2 µlに以下の溶液を加える。

| | |
|---------------|--------|
| 10×PCR buffer | 2.5 µl |
| dNTP mix | 1.8 µl |
| プライマー1 | 1 µl |

プライマー2

滅菌水

e) d) の溶液を95℃で5分加熱した後、氷上で急冷した後、Taq DNA Polymerase (5 U/ml) を0.125 μl 加える。

f) e) にミネラルオイルを重層して以下の条件でPCR反応を行う。(94℃, 1分; 60℃, 2分; 72℃, 2分) からなる一連の処理を30サイクル行った後、72℃で3分処理する。

g) 次いで、アガロースゲル電気泳動にかける。その結果、プライマー1と2を用いたとき、図3に示すように約400bpの断片の増幅が確認できた。図3は、アガロース電気泳動の結果を示す模写図である。図中、レーン1はφX174/HincII (マーカー)、レーン2はプライマー1及び2を用いた電気泳動パターンである。マーカーはPCRにより増幅した断片のサイズを判断するために泳動を行った。

【0037】3. PCR断片のサブクローニング

上記2. で得た約400bpのPCR断片をアガロースゲルから切り出し、DNA回収用フィルター付遠心チューブ(孔径0.22 μm、宝酒造社製Code No. 9040)を用いて、10,000 rpm、4℃、1時間の遠心の後、エタノール沈殿を行うことで精製した。次いで、PCR断片(1 μl)、K buffer (1 μl)、BamHI (1 μl) 及び滅菌水(7 μl)を混合し、37℃で4時間の消化を行った。得られたBamHI消化断片を、同じくBamHIで消化したpBluescript II SK+ (STRATAGENE社製: lacプロモーターを有する大腸菌用発現ベクター)に、ライゲーション(16℃・30分)し、得られたライゲーション混合物を用いて大腸菌JM109株を形質転換した。形質転換は、Takara Ligation Kit Ver. 2.0 (宝酒造)を使用し、Hanahan法(Hanahan, D., Techniques for Transformation of *E. coli*. In: DNA Cloning, vol I, Glover, D.M.(ed), pp109-136, IRL Press, 1985)に従って行った。その結果、図4に示すように、約400bpのPCR断片がpBluescript II SK+のBamHIサイトに挿入されたプラスミドpFALPを得た。図4において、レーン1はλ/EcoT141 (マーカー)を、レーン2はpFALP/BamHIを表す。その塩基配列をジデオキシ法により決定したところ、FAOD-LのcDNAの部分配列であることが確認された。

【0038】4. cDNAライブラリーの作成及びブラークハイブリダイゼーション

上記の2. 2)の方法で得たtotal RNAからmRNA Purification Kit (ファルマシア社)を用いてmRNAを得た。該mRNA 5 μgから、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社製)を用いてcDNAライブラリーを作成した。即ちmRNA 5 μgから逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、λZAP IIベク

1 μl

16.575 μl

ター(STRATAGENE社製)に連結し、Gigapack III Gold (STRATAGENE社製)を用いてインビトロでパッケージングしてcDNAライブラリーを得た。(条件等はマニュアルに従った。)

次いで、cDNAのタイターを測定した結果、 1.0×10^5 pfu/μgベクターであった。このファージライブラリーを大腸菌XLI-Blue MRF株に感染させ、37℃で12時間培養することによりプラークを形成させた。次いで、3.でサブクローニングしたPCR断片を³²Pで標識してプローブとして用い、プラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。即ち、得られたプラークをニトロセルロースフィルターに転写し、アルカリ変性後、42℃で³²Pで標識したプローブと12時間ハイブリダイズさせた。洗浄後、X線フィルムに12時間露光させた。その結果、約20,000プラークから7つの陽性プラークを得た。

【0039】5. FAOD-LをコードするDNAのサブクローニング

FAOD-LをコードするDNAのプラスミドへのサブクローニングはインビトロ切除法で行った。7個の陽性プラークからExAssistヘルパーファージ(STRATAGENE社製)を用いて添付のマニュアルに従い、大腸菌JM109 (*E. coli* JM109 Competent Cell, 宝酒造株式会社)に形質転換した。得られた形質転換体からプラスミドを抽出し塩基配列を決定した。その結果、FAOD-LのN末端アミノ酸配列に相当する塩基配列を有する約1.5 kbのDNA断片が挿入されたプラスミドpFAL2を保持するクローンを1株得た(大腸菌形質転換体(*E. coli* JM109/pFAL2))。このpFAL2の制限地図を図2に示す。該クローンの塩基配列及び推定のアミノ酸配列を配列番号1に示す。又、該プラスミドpFAL2を用いて大腸菌SOLR (STRATAGENE社)を形質転換して大腸菌形質転換体(*E. coli* SOLR/pFAL2)を得た。

【0040】実施例2 酵母でのFAOD-Lの発現

(1) FAOD-L発現ベクターの構築

アスペルギルス・テレウス GP1 (*Aspergillus terreus* GP1: FERM-15664)由来のクローン化cDNAを含む大腸菌発現ベクターpFAL2を、*E. coli* JM109/pFAL2 (実施例1)から得た。得られたpFAL2を鋳型としてFAOD-LのN末端とC末端に相当する2種のプライマー(配列番号6及び7)を用いて以下の条件でPCRを行って約1.3 kbのFAOD-L cDNA断片を得た。PCR条件: [94℃, 1分; 60℃, 1分; 72℃, 3分]を30サイクル+72℃, 5分を1回。アガロース電気泳動後、断片を常法通り精製し、FAOD-L cDNA断片を得た。

【0041】プラスミドpNOTel（特開平5-344895）を制限酵素NotIにより消化した後、ウシ腸ホスファターゼ（ベーリンガーマンハイム社）を用いて脱リン酸化処理し、上記の、FAOD-LcDNA断片と共にDNA Blunting Kit（宝酒造株式会社）を用いて平滑化した。これらをDNA ligation Kit（宝酒造株式会社）を用いて連結し、プラスミドpNFLを得た。次いで、プラスミドpNFLを用い、Hanahan法（前掲）で*E. coli* JM109株を形質転換した。得られた形質転換体から任意に84株を選択してプラスミドを調製した。プラスミドを制限酵素HindIIIで処理して挿入片の方向性を確認し、FAOD-LcDNA断片がAODプロモーターの下流に挿入されているプラスミドpNFL8を得た。該プラスミドpNFL8の制限地図を図5に示す。

【0042】（2）形質転換

上記のプラスミドpNFL8を、制限酵素BamHIにより直鎖状にした後、リチウム改変法を用いて*C. boidinii* TK62株に形質転換した。このTK62株はUra要求性であり、プラスミドpNOTelにはURA3遺伝子が含まれているので、Ura要求を指標に形質転換体を選抜することができる。形質転換体をUraを含まないYNB培地に塗布することにより得られたURA⁺型の形質転換体から任意に14株を選び、1.5%メタノール含有基本培地に接種し、28℃で3日間震盪培養した。集菌後、菌体内のFAOD-L活性を上記の力価測定法のA. 速度法により測定し、表1の結果を得た。なお、以下の実施例におけるFAOD-Lの力価測定は同様の方法で行った。

【0043】表1 pNFL8により形質転換された*C. boidinii*のFAOD-L活性

【表1】

| 株 | 比活性 (U/mg タンパク) | 株 | 比活性 (U/mg タンパク) |
|------------|--------------------|----|--------------------|
| TK62/pNEP1 | 0.13 | 8 | N.D. |
| 2 | 0.13 | 9 | 0.12 |
| 3 | N.D.*1 | 10 | 0.13 |
| 4 | 0.15 | 11 | 0.17 |
| 5 | 0.15 | 12 | 0.16 |
| 6 | 0.13 | 13 | N.D. |
| 7 | 0.12 | 14 | 0.44 |
| 対照 *2 | N.D. | | |

注：1. 検出されず

2. pNOTelで形質転換した*C. boidinii* TK62株
表1から明らかに、11株にFAOD-L活性が認められ、その内、FLC14株が最大の活性を示した。

【0044】（3）形質転換体のサザン解析

C. boidinii TK62株の染色体DNAに挿入されたプラスミドのコピー数を決定するためにサザン解析を行った。活性の異なる形質転換体3株より染色体DNAを抽出し、制限酵素EcoRIで消化した後、アガロースゲル電気泳動に供し、常法通りサザンブロッティングした。プローブとしてURA3遺伝子を用い、プローブの標識はDIG-ELISA法により行った。結果は図8に示すように、強い活性を示す*C. boidinii* TK62/pNEL14株のみにおいて8.8kbの断片が認められたので、2コピー以上のFAOD-LcDNA断片が染色体DNAに挿入されていることが予想された。それ以外のものは全てシングルコピーであった。これは、挿入されているコピ

ーが1つの時はEcoRI処理により、*C. boidinii*のEcoRI認識部位とpNFL8のEcoRI認識部位から9.1kbの断片が切り出されるだけであるのに対して、2つ以上のコピーが挿入されていれば、2カ所のpNFL8のEcoRI認識部位から切り出される断片が生じ、この断片のサイズが8.8kbであることによるものである。

【0045】（4）FAOD-L活性を有する形質転換体の培養条件の検討

上記（3）で最も高活性を示した形質転換体*C. boidinii* TK62/pNEP14株を用い、好適な培養条件を検討した。1.5%メタノールを含有する基本培地を用い、無機窒素源を種々変えて培養しFAOD-L活性を測定した。その結果を表2に示す。

表2 *C. boidinii* TK62/pNEP14株によるFAOD-L生産に対する窒素源の影響

【表2】

| N-源 | 活性 (U/ml) | 比活性 (U/mg) |
|---|--------------|---------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1.57 | 0.549 |
| NH ₄ Cl | 1.68 | 0.737 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.48 | 0.687 |
| NaNO ₃ | 1.65 | 0.689 |

表2から、窒素源としてNH₄Clが好ましいことが分かる。その培地中の含有量は、0.1～5.0%、より好ましくは0.5～2.0%である。

【0046】次いで、酵母エキス濃度を種々変化させて検討した結果、下記の表3に示すように、酵母エキス濃度が高いほど、FAOD-L活性が上昇する。好ましい

酵母エキス濃度は0.1～5.0%、より好ましくは約1%である。

表3 *C. boidinii* TK62/pNEP14株によるFAOD-L生産に対する酵母エキス濃度の影響

【表3】

| 酵母エキス 濃度 (%) | 活性 (U/ml) | 比活性 (U/mg) |
|-----------------|--------------|---------------|
| 0.2 | 1.29 | 0.451 |
| 0.4 | 1.10 | 0.383 |
| 0.6 | 1.90 | 0.366 |
| 0.8 | 1.52 | 0.342 |
| 1.0 | 2.25 | 0.283 |

【0047】さらに、炭素源として1.5%メタノール、1.5%メタノール+3%グリセロール、3%グリセロールのいずれかを含有する培地で*C. boidinii* TK62/pNEP14株を培養しFAOD-L生産のタイムコースをとったところ、図9に示すように、メタノール培地でのみ、顕著な生産が認められ、培養40時間で最大の生産性を示した。以上の実験の結果から、FAOD-L生産能力を有する形質転換体の培養に適した培地は、メタノール0.1～5.0%、好ましくは1.5%を含有する基本培地に、0.1～5.0%、より好ましくは0.5～2.0%のNH₄Cl及び/又は0.1～5.0%、より好ましくは1%の酵母エキスを含有するものであることが分かる。

【0048】(5) *C. boidinii* TK62/pNEP14株のジャーファーマンターを用いた大量培養
C. boidinii TK62/pNEP14株を15L容のジャーファーマンターを用い、1Lの培地中で培養することにより、FAOD-Lの大量生産を行った。培地は以下の方法で調整した。1L中に(NH₄Cl:5g, K₂HPO₄:1g, NaH₂PO₄:1g, MgSO₄·2H₂O:0.5

g, CaCl₂·2H₂O:0.1g, 酵母エキス:10g)を含有する混合物を、pH6.0に調整し、120℃、20分オートクレイブ処理した後、1.5%になるようにメタノールを加える。その結果、図10に示すように、培養40時間でFAOD-Lの生産は最大になり、40時間を過ぎると生産性の減少が認められた。次いで、得られた培養物を、遠心分離(10,000rpm、4℃、1分)により集菌し、ペレットを0.85% KClで洗浄し、0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)に懸濁した。MINI-BEAT BEATER(ジャパンラムダ社)で菌体を3,800rpm、30秒で氷冷をはさみながら6回ビーズ破碎し、遠心分離(1,400rpm、4℃、5分)して無細胞抽出液を調製した。このものを以後、酵素液として用いた。

【0049】実施例3 糖化ヒト血清アルブミン濃度の測定

糖化ヒト血清アルブミン(シグマ社)を0.9%塩化ナトリウム水溶液で溶解させ、0～1.0%の範囲で濃度の異なる糖化ヒト血清アルブミン溶液を調製した。これらの溶液を用いて以下の操作を行った。

1) プロテアーゼ処理

糖化アルブミン溶液

60μl

12.5mg/ml プロテアーゼXIV(シグマ社)溶液

60μl

この混合液を37℃で30分間インキュベートし、その後、約90℃で5分間、加熱して反応を停止させた。

【0050】2) 活性測定

FAOD反応液は以下のようにして調製した。

| | |
|--|-------|
| 45mM 4-アミノアンチピリン溶液 | 30μl |
| 60mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン溶液 | 30μl |
| 60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液 | 30μl |
| 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) | 300μl |
| 6ユニット/ml FAOD-L溶液 | 50μl |

蒸留水で全量を1mlとした。6ユニット/ml FAOD-L溶液は、実施例1の方法で得たFAOD-Lを6ユニット/mlになるよう、0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) で希釈して調製した。FAOD反応液を30℃で2分間インキュベートした後、上記の各プロテアーゼ処理溶液を100μl加え、30分後の555nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られる糖化アルブミンの濃度と吸光度との関係を図11に示す。図中の縦軸は555nmの吸光度 (過酸化水素の量に対応)、横軸は糖化アルブミンの濃度を表す。図は、糖化アルブミンの濃度と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示し

1) プロテアーゼ処理

| | |
|-------------------------------|------|
| 糖化アルブミン溶液 | 60μl |
| 12.5mg/ml プロテアーゼXIV (シグマ社) 溶液 | 60μl |

この溶液を37℃で30分間インキュベートし、その後、約90℃で5分間加熱して反応を停止させた。

| | |
|--|-------|
| 45mM 4-アミノアンチピリン溶液 | 30μl |
| 60mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン溶液 | 30μl |
| 60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液 | 30μl |
| 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) | 300μl |
| 6ユニット/ml FAOD-L溶液 | 50μl |

蒸留水で全量を1mlとした。6ユニット/ml FAOD-L溶液は、実施例1の方法で得たFAOD-Lを6ユニット/mlになるよう、0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) で希釈して調製した。FAOD反応液を30℃で2分間インキュベートした後、上記の各プロテアーゼ処理溶液を100μl加え、30分後の555nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られるアルブミンの糖化率と吸光度との関係を図12に示す。図中の縦軸は555nmの吸光度 (過酸化水素の量に対応)、横軸は

1) プロテアーゼ処理

| | |
|------------------------|------|
| 糖化ヘモグロビン溶液 | 25μl |
| 500ユニット/ml アミノペプチダーゼ溶液 | 5μl |
| 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) | 20μl |

この混合液を30℃で30分間インキュベートした。その後、10%トリクロロ酢酸を50μl加えて攪拌し、0℃で30分間静置した後12000回転で10分間遠心分離を行った。得られた上清に2M NaOHを約5

| | |
|-----------------------------|-------|
| 3mM N-カルボメチルアミノ-2-フェニルアミン溶液 | 30μl |
| 60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液 | 30μl |
| 0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) | 300μl |
| 4ユニット/ml FAOD-L溶液 | 10μl |

蒸留水で全量を1mlとした。4ユニット/ml FAOD

ている。

【0051】実施例4 ヒト血清アルブミンの糖化率の測定

0.9%塩化ナトリウム水溶液3mlに、糖化ヒト血清アルブミン (シグマ社) 150mg、ヒト血清アルブミン (シグマ社) 150mgをそれぞれ溶解した。これらの溶液を混合することにより、糖化率の異なる溶液を作製し、自動グリコアルブミン測定装置 (京都第一科学) を用いて検定したところ、その糖化率は、24.6%~61.1%であった。これらの溶液を用いて以下の操作を行った。

【0052】2) 活性測定

FAOD反応液は以下のようにして調製した。

アルブミンの糖化率を表す。図は、アルブミンの糖化率と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

【0053】実施例4 糖化ヘモグロビン濃度の測定
グリコヘモグロビンコントロール (シグマ社) を蒸留水で溶解させ、0~30%の範囲で濃度の異なる糖化ヘモグロビン溶液を調製した。これらの溶液を用いて以下の操作を行った。

【0054】2) 活性測定

FAOD反応液は以下のようにして調製した。

-L溶液は、実施例1の方法で得たFAOD-Lを4ユ

ニット/μlになるよう、0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で希釈して調製した。FAOD 反応液を 30℃ で 2 分間インキュベートした後、上記の各プロテアーゼ処理溶液を 80 μl 加え、30 分後の 727 nm における吸光度を測定した。この方法で得られる糖化ヘモグロビンの濃度と吸光度との関係を図 13 に示す。図中の縦軸は 727 nm の吸光度 (過酸化水素の量に対応)、横軸は糖化ヘモグロビンの濃度を表す。図は、糖化ヘモグロビンの濃度と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

【0055】

【配列表】

【0056】配列番号: 1

配列の長さ: 1314

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: *Aspergillus terreus* GP1

配列

| | |
|---|-----|
| ATG CCA GTC ACC AAG TCT TCG TCG ATA TTG ATC ATC GGG GCG GGC | 45 |
| Met Pro Val Thr Lys Ser Ser Ser Ile Leu Ile Ile Gly Ala Gly | |
| 1 5 10 15 | |
| ACC TGG GGT TGC TCA ACT GCC CTG CAT CTT GCC CGC AGA GGA TAC | 90 |
| Thr Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr | |
| 20 25 30 | |
| ACC AAT GTC ACT GTC CTT GAC CCG TAC CCG GTT CCA TCA GCC ATT | 135 |
| Thr Asn Val Thr Val Leu Asp Pro Tyr Pro Val Pro Ser Ala Ile | |
| 35 40 45 | |
| TCG GCC GGC AAC GAC GTC AAC AAG ATC ATC TCG TCC GGC CAG TAC | 180 |
| Ser Ala Gly Asn Asp Val Asn Lys Ile Ile Ser Ser Gly Gln Tyr | |
| 50 55 60 | |
| AGC AGC AAG AAG GAC GAG GTC GAA GTC AAT GAG ATT ATC GCC GAA | 225 |
| Ser Ser Lys Lys Asp Glu Val Glu Val Asn Glu Ile Ile Ala Glu | |
| 65 70 75 | |
| CAG GCC TTC AAT GGC TGG AAA AAT GAC CCC ATC TTC AAG CCG TAC | 270 |
| Gln Ala Phe Asn Gly Trp Lys Asn Asp Pro Ile Phe Lys Pro Tyr | |
| 80 85 90 | |
| TAC CAC GAC ACC GGC GTC GTG ATG TCC GCC ACC ACA CAG GAA GGA | 315 |
| Tyr His Asp Thr Gly Val Val Met Ser Ala Thr Thr Gln Glu Gly | |
| 95 100 105 | |
| TTG GAG CGT CTG GGG GTC CGC GTG CGA CCT GAA GAT GAA CCC GAT | 360 |
| Leu Glu Arg Leu Gly Val Arg Val Arg Pro Glu Asp Glu Pro Asp | |
| 110 115 120 | |
| GTA GCC GAA TTG ACT CGG CCG GAG CAG TTC CGC CAG CTG GCC CCC | 405 |
| Val Ala Glu Leu Thr Arg Pro Glu Gln Phe Arg Gln Leu Ala Pro | |
| 125 130 135 | |
| GGC GTC TTG AAG GGT AAC TTC CCC GGT TGG AGG GGG TAC CAC ATT | 450 |
| Gly Val Leu Lys Gly Asn Phe Pro Gly Trp Arg Gly Tyr His Ile | |
| 140 145 150 | |
| CGC TCA AAC GCG GGC TGG GCG CAT GCG CGC AAC GCC CTG GTC GCC | 495 |
| Arg Ser Asn Ala Gly Trp Ala His Ala Arg Asn Ala Leu Val Ala | |
| 155 160 165 | |
| GCG GCG CGG GAG GCA CAG CGC CTG GGT GTG CGC TTC GTC GCG GGA | 540 |
| Ala Ala Arg Glu Ala Gln Arg Leu Gly Val Arg Phe Val Ala Gly | |
| 170 175 180 | |
| TCG CCG CAG GGC AGA GTC ATC ACG TTG ATT TTT GAG AAC AAC GAT | 585 |
| Ser Pro Gln Gly Arg Val Ile Thr Leu Ile Phe Glu Asn Asn Asp | |
| 185 190 195 | |

| | |
|---|------|
| GTG AAG GGT GCC GTC ACG GCG GAC GGC AAG ATC TGG CGG GCC GAG | 630 |
| Val Lys Gly Ala Val Thr Ala Asp Gly Lys Ile Trp Arg Ala Glu | |
| 200 205 210 | |
| CAG ACT ATC CTC TGC GCT GGT GCG GCC GCC GGC CAG TTT CTG GAT | 675 |
| Gln Thr Ile Leu Cys Ala Gly Ala Ala Ala Gly Gln Phe Leu Asp | |
| 215 220 225 | |
| TTC AAG GAC CAA CTG CGT CCC ACT GCG TGG ACT CTG GTC CAC ATC | 720 |
| Phe Lys Asp Gln Leu Arg Pro Thr Ala Trp Thr Leu Val His Ile | |
| 230 235 240 | |
| CAG TTG AAG CCG GAA GAG CGT GCC CAG TAT AAA AAC ATG CCG GTG | 765 |
| Gln Leu Lys Pro Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Lys Asn Met Pro Val | |
| 245 250 255 | |
| GTC TTC AAC ATC GAG AAG GGG TTC TTC TTC GAG CCG GAT GAG GAG | 810 |
| Val Phe Asn Ile Glu Lys Gly Phe Phe Phe Glu Pro Asp Glu Glu | |
| 260 265 270 | |
| CGT GGT GAA ATC AAG ATC TGC GAC GAA CAC CCC GGG TAC ACG AAT | 855 |
| Arg Gly Glu Ile Lys Ile Cys Asp Glu His Pro Gly Tyr Thr Asn | |
| 275 280 285 | |
| ATG ACC ACG GGG GCC GAC GGC CGC GTG AGG AGC ATT CCC TTC GAG | 900 |
| Met Thr Thr Gly Ala Asp Gly Arg Val Arg Ser Ile Pro Phe Glu | |
| 290 295 300 | |
| AAG ACG CAG GTT CCT CGA GAA GCG GAG ATG CGC GTC CGC AAG CTT | 945 |
| Lys Thr Gln Val Pro Arg Glu Ala Glu Met Arg Val Arg Lys Leu | |
| 305 310 315 | |
| CTG TCT GAA ACG ATG CCT CAG CTT GCG GAC CGG CCG TTC AGT TTC | 990 |
| Leu Ser Glu Thr Met Pro Gln Leu Ala Asp Arg Pro Phe Ser Phe | |
| 320 325 330 | |
| GCA AGG ATC TGC TGG TGT GCG GAT ACC CCC AAT CGC GAG TTT ATC | 1035 |
| Ala Arg Ile Cys Trp Cys Ala Asp Thr Pro Asn Arg Glu Phe Ile | |
| 335 340 345 | |
| ATT GAC CGT CAT CCC GAA TAC CCG TCG CTT GTT CTT GGG TGT GGT | 1080 |
| Ile Asp Arg His Pro Glu Tyr Pro Ser Leu Val Leu Gly Cys Gly | |
| 350 355 360 | |
| GCT TCA GGA CGA GGC TTC AAA TAT CTT CCC TCG ATC GGA AGC ATC | 1125 |
| Ala Ser Gly Arg Gly Phe Lys Tyr Leu Pro Ser Ile Gly Ser Ile | |
| 365 370 375 | |
| ATC GCA GAC GCC ATG GAG GAC AAA ACC CCG GCA AAA ATC CAC AAG | 1170 |
| Ile Ala Asp Ala Met Glu Asp Lys Thr Pro Ala Lys Ile His Lys | |
| 380 385 390 | |
| CTG ATC CGC TGG AGC CCG GAA ATC GCG ATC AAC CGT AAC TGG GGG | 1215 |
| Leu Ile Arg Trp Ser Pro Glu Ile Ala Ile Asn Arg Asn Trp Gly | |
| 395 400 405 | |
| GAC AGA TTA GGT CGA TTT GGA GGG CCC AAC CGG GTC ATG GAT TTC | 1260 |
| Asp Arg Leu Gly Arg Phe Gly Gly Pro Asn Arg Val Met Asp Phe | |
| 410 415 420 | |
| AAT GAA GTG AAG GAG TGG ACT AAT GTC ACC CAA AGG GAC ATC TCG | 1305 |
| Asn Glu Val Lys Glu Trp Thr Asn Val Thr Gln Arg Asp Ile Ser | |
| 425 430 435 | |
| AAG TTA TAG 1314 | |
| Lys Leu | |

437

【0057】配列番号: 2

配列の長さ: 17

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

起源

生物名: Aspergillus terreus GP1

配列

Pro Val Thr Lys Ser Ser Ser Ile Leu

Ile Ile Gly Ala Gly Thr Trp

1

5

10

15

Gly

17

【0058】配列番号: 3

配列の長さ: 16

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

起源

生物名: Aspergillus terreus GP1

配列

Leu Thr Arg Pro Glu Gln Phe Arg Gln Leu Ala Pro Gly Val Leu Lys

1

5

10

16

【0059】配列番号: 4

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

YTNATHATHG GNGCNGN C NTGG

24

【0060】配列番号: 5

配列の長さ: 26

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

CCNGGNGCNA RYTGNCCKRAA YTG YTC

26

【0061】配列番号: 6

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

ATAATGCCAG TCACCAAGTC T

21

【0062】配列番号: 5

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

GATAGATTAA CTATTATACA TCGA

24

【図面の簡単な説明】

【図1】 PCRに用いるためのプライマーの、FAOD-Lの部分アミノ酸配列との関係を示す説明図。

【図2】 FAOD-LをコードするDNAを含むプラスミドpFAL2の制限地図。

【図3】 RT-PCRにおけるアガロース電気泳動の結果を示す模写図であって、図中、レーン1は ϕ X174/HincII;レーン2はプライマー1及び2を用

いた電気泳動パターンを表す。

【図4】 図3の約400bpのPCR断片のサブクローニングにおける電気泳動の結果を示す模写図であって、図中、レーン1は λ /EcoT141、レーン2はpFLP/BamHIの泳動パターンを表す。

【図5】 FAOD-L発現ベクターpNFL8の制限地図。

【図6】 アスペルギルス・テレウス GP1 (Asper

gillus terreus GP1; FERM P-15664) 由来の精製FAOD-LをSDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動) にかけて得た移動パターンを示す写真。

【図7】 図6と同様のFAOD-Lの、スーパーデックス200pgを用いたゲルろ過による分子量測定の結果を示すグラフ。

【図8】 pNFL8により形質転換された*C. boidinii* 形質転換体の染色体DNAのサザン解析の結果を示すアガロース電気泳動パターンの模写図。

【図9】 *C. boidinii* TK62/pNEP14株の、1.5%メタノール、1.5%メタノール+3%グリセロール又は3%グリセロールを含有する培地でのFAOD-L活性産

生のタイムコースを示すグラフ。

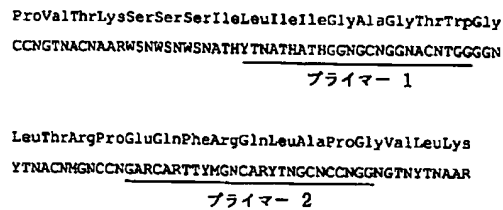
【図10】 *C. boidinii* TK62/pNEP14株のジャーファーメンター培養におけるFAOD-L活性産生のタイムコースを示すグラフ。

【図11】 糖化ヒト血清アルブミンの濃度とFAOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

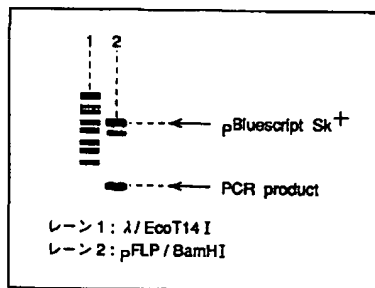
【図12】 ヒト血清アルブミンの糖化率とFAOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

【図13】 糖化ヘモグロビンの濃度とFAOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

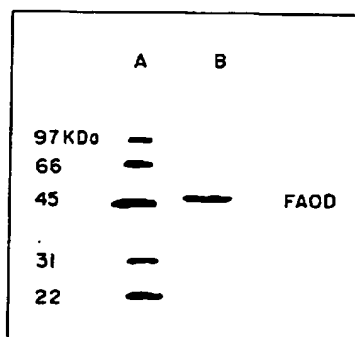
【図1】



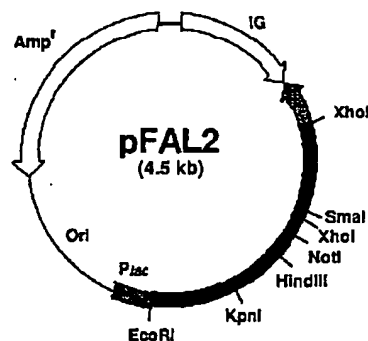
【図4】



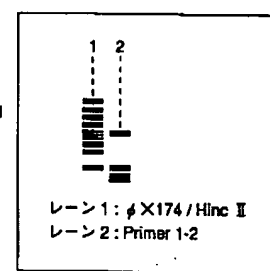
【図6】



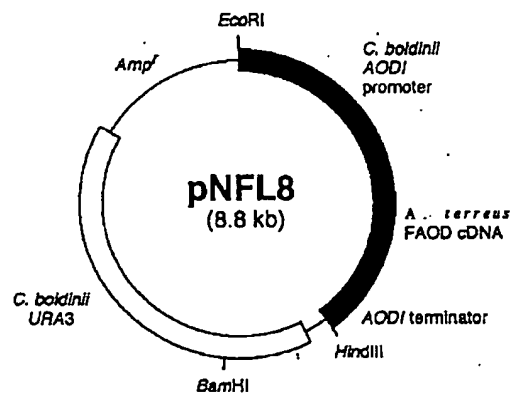
【図2】



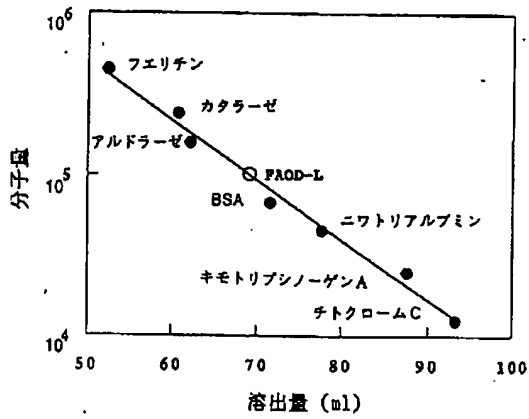
【図3】



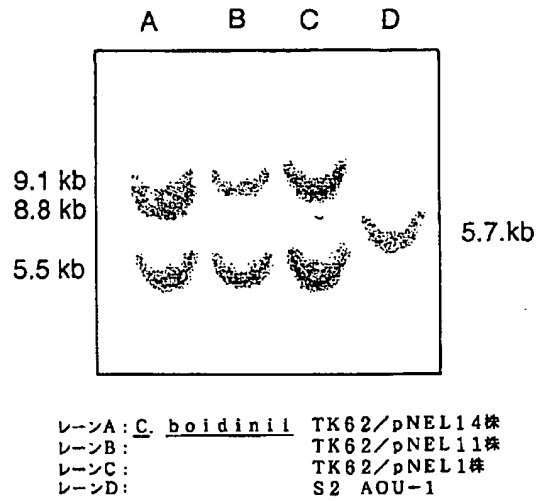
【図5】



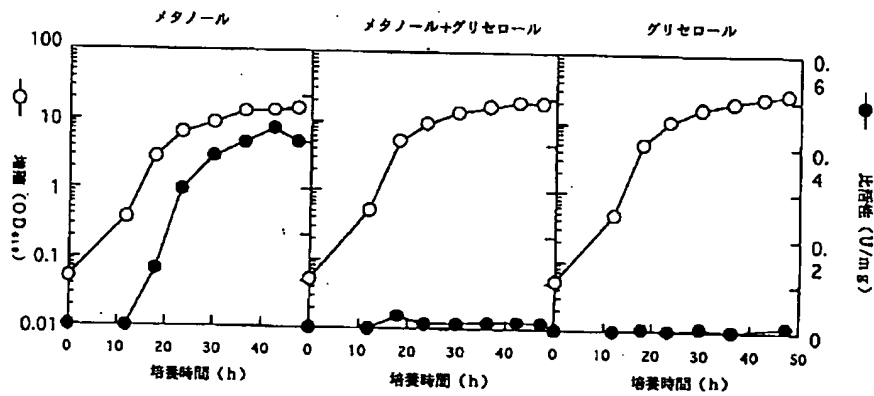
【図7】



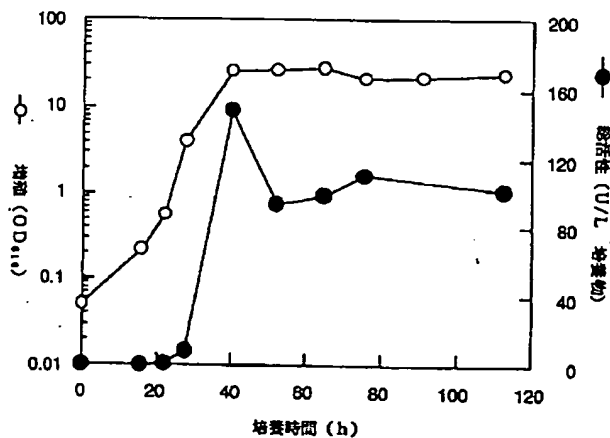
【図8】



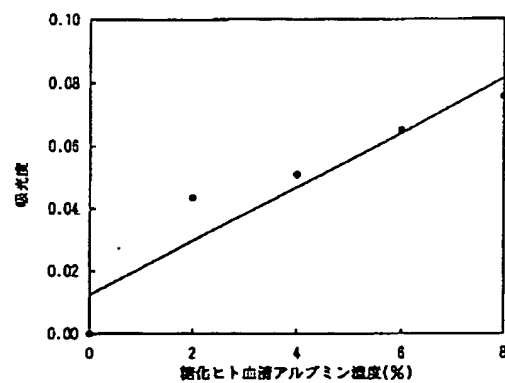
【図9】



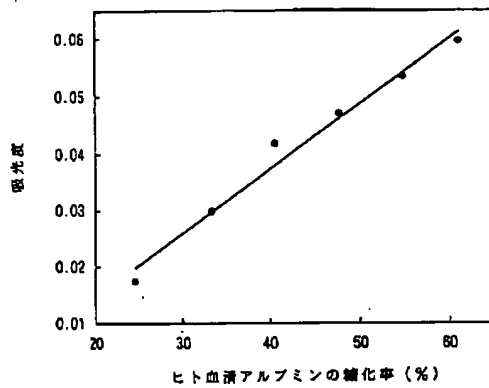
【図10】



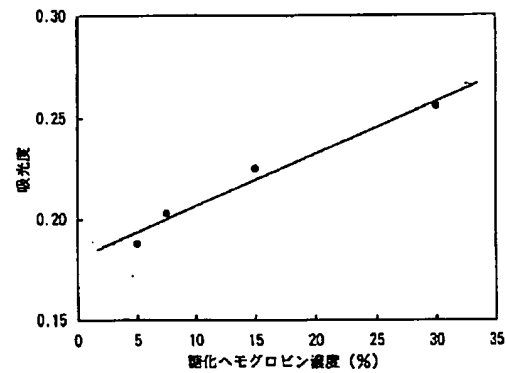
【図11】



【図12】



【図13】



フロントページの続き

| (51)Int. Cl. ⁶ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|------|---------|---------------|--------|
| C 1 2 Q 1/26 | | 9452-4B | C 1 2 Q 1/26 | |
| G 0 1 N 33/66 | | | G 0 1 N 33/66 | |
| | | | 33/68 | |
| //(C 1 2 N 1/19 | | | | |
| C 1 2 R 1:72) | | | | |
| (C 1 2 N 9/06 | | | | |
| C 1 2 R 1:72) | | | | |

(72)発明者 福家 博司
 京都府京都市南区東九条西明田町57番地
 株式会社京都第一科学内